

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.08.2004

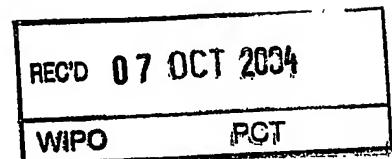
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 9月30日
Date of Application:

出願番号 特願2003-342126
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-342126]

出願人 タカラバイオ株式会社
Applicant(s):

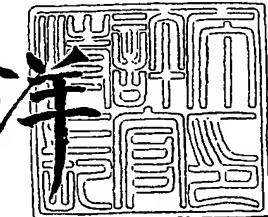


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

八月廿四



【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1855
【提出日】 平成15年 9月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 9/22

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 佐川 裕章

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 友野 潤

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 上野 はるみ

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】
【識別番号】 302019245
【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社
【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 173212
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

d s RNA分解活性を有するタンパク質であって、d s RNAに作用して特定の長さのd s RNAを生成することを特徴とするd s RNA分解活性を有するタンパク質。

【請求項2】

d s RNA分解活性を有するタンパク質が、Dicerの機能ドメインを有することを特徴とする請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】

Dicerの機能ドメインが、RNase IIIa、bならびにd s RNA結合ドメインからなることを特徴とする請求項2記載のタンパク質。

【請求項4】

さらにPAZドメインを含むことを特徴とする請求項3記載のタンパク質。

【請求項5】

特定の長さのd s RNAが、約15～30塩基対のd s RNAであることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項6】

d s RNA分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列、あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項7】

d s RNA分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載のd s RNA分解活性を有するタンパク質を製造する方法であって、コドンを宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用することを特徴とするd s RNA分解活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項9】

請求項1～7のいずれか1項に記載のd s RNA分解活性を有するタンパク質の製造方法であって、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることを特徴とするd s RNA分解活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項10】

請求項1～7のいずれか1項に記載のd s RNA分解活性を有するタンパク質を含有するキット。

【請求項11】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でd s RNAにd s RNA分解活性を有するタンパク質を作らせ、特定の長さのd s RNAを生成することを特徴とするd s RNAの分解方法。

【請求項12】

核酸結合活性を有するタンパク質とd s RNA分解活性を有するタンパク質が融合タンパク質であることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】

核酸結合活性を有するタンパク質が、RNA結合活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

RNA結合活性を有するタンパク質がコールドショックプロテインであることを特徴

とする請求項13記載の方法。

【請求項15】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項16】

コールド ショック プロテインがサーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBであることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】

特定の長さのdsRNAが、約15～30塩基対のdsRNAであることを特徴とする請求項11～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、請求項1～7のいずれか1項に記載のタンパク質であることを特徴とする請求項11～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、天然型Dicerあるいはその機能的同等物であることを特徴とする請求項11～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でRNA合成活性を有するタンパク質を用いてRNA合成反応を行うことを特徴とするRNAの合成方法。

【請求項21】

核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を用いることを特徴とする請求項20記載の方法。

【請求項22】

核酸結合活性を有するタンパク質が、コールド ショック プロテインであることを特徴とする請求項20又は21記載の方法。

【請求項23】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項22記載の方法。

【請求項24】

コールド ショック プロテインが、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBであることを特徴とする請求項23記載の方法。

【請求項25】

RNA合成活性を有するタンパク質が、DNA依存性RNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項20～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

請求項11～19のいずれか1項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びにdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項27】

請求項11～19のいずれか1項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。

【請求項28】

請求項20～25のいずれか1項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項29】

請求項20～25のいずれか1項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】d s RNA分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質を用いたd s RNA分解方法ならびにRNA合成方法

【技術分野】**【0001】**

本発明は、特定の長さのd s RNAを生成する活性を有する、d s RNA分解活性を有するタンパク質、当該タンパク質と核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質を組み合わせたd s RNAの効率的な分解方法並びに核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を組み合わせたRNAの効率的な合成方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

最近、低分子d s RNAを利用する遺伝子工学的手法が報告されている。

例えば、RNA干渉(RNAi:RNA interference)は、d s RNAによってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象である。d s RNAによって遺伝子サイレンシングができることがわかった発端は、線虫におけるアンチセンスを用いた研究からであった。1995年、GuoとKemphuesはpar-1と呼ばれる遺伝子をアンチセンスRNAで抑制する実験を行なった。アンチセンスRNAを加えると、予想通りpar-1の発現を抑制したが、驚いたことに、コントロールとして用いたセンスRNAも同様にpar-1の発現を抑制し、par-1変異株の表現形を示した。(例えば、非特許文献1)

この矛盾は、1998年にFireらによって解き明かされた。アンチセンスRNAとセンスRNAを、それぞれRNAポリメラーゼを用いて合成するとき、わずかに非特異的に逆向きのRNAができてしまう。そのコンタミネーションによってできるd s RNAが遺伝子サイレンシングの本体であり、アンチセンスRNAおよびセンスRNAは遺伝子の発現を抑制できること、またアンチセンスRNAとセンスRNAをアニールさせたd s RNAが効率よく遺伝子の発現を抑制できることが明らかとなった。(例えば、非特許文献2)

【0003】

上記RNA干渉においては、Dicerと呼ばれる酵素がd s RNAから小分子のRNA(siRNA:short interfering RNA)を生成させる。(例えば、非特許文献3)

この酵素の作用により生じたsiRNAは、RISC(RNA induced silencing complex)と呼ばれる複合体に取り込まれ、該複合体が標的mRNAを認識し、分解すると考えられている。しかしながら、RNA干渉に関与すると考えられる各因子についての正確な機能についてはまだまだ未知の部分が多いのが現状であった。(例えば、非特許文献4)

【0004】

上記RNA干渉を効率よく行うためには、d s RNAならびにsiRNAを効率よく生成することが重要である。上記Dicerとしてはヒト由来Dicer(例えば、非特許文献5)が例示され、さらにリコンビナントDicer(例えば、非特許文献6)がジーンセラピーシステムズ社あるいはストラタジーン社より販売されている。

しかしながら、上記のようなリコンビナントDicerについては、本来の酵素学的な性能を十分に發揮しているかどうかについては詳細に検討されていない。また、上記Dicerの少なくともどのドメインを含有すれば、d s RNAに作用させて好適なd s RNA(siRNA)を生成させる活性を保持することができるか、さらにその遺伝子工学的な生産性を向上できるかについては知られていない。

さらに、d s RNAを効率よく生成させる方法についても特に有効な方法は知らないのが現状であった。

【0005】

さらに、RNAポリメラーゼを用いて合成した約21ヌクレオチドの鎖長のd s RNAをそのまま si RNAとして利用する方法も報告されている（例えば、非特許文献7）。従って、RNAが効率よくできる方法があれば上記方法にも利用できる。

【0006】

【非特許文献1】Guo S. 他1名 Cell 1995年 vol. 81, p 6
11-620

【非特許文献2】Fire A. 他5名 Nature 1998年 vol. 39
、p 806-811

【非特許文献3】Bernstein E. 他3名 Nature 2001年 v
ol. 409, p 363-366

【非特許文献4】Tabara H. 他3名 Cell 2002年 vol. 10
9, p 861-871

【非特許文献5】Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2
002年 vol. 21, No. 21, p 5875-5885

【非特許文献6】Myers J. W. 他3名 Nature biotechno
logy 2003年 vol. 21, p 324-328

【非特許文献7】Donze O. 他1名 Nucleic Acids Rese
arch 2002年 vol. 30, No. 10, e46

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、特定の長さのd s RNAを生成させる活性を有する、d s RNA分解活性を有するタンパク質の提供、RNA干渉等に利用可能な特定の長さのd s RNAを効率よく生成させる方法並びにRNA合成の促進方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、Dicerの機能ドメインを解析し、長鎖のd s RNAに作用して特定の長さのd s RNAを生成させる活性を有する、d s RNA分解活性を有するタンパク質を見出した。また、核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質の共存下でd s RNAにd s RNA分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さのd s RNAを効率よく調製できること、さらに当該核酸結合活性を有するタンパク質がd s RNA合成に代表されるRNA合成反応においてもその効率を向上させることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明の第1の発明は、d s RNA分解活性を有するタンパク質であって、d s RNAに作用して特定の長さのd s RNAを生成する活性を有することを特徴とするd s RNA分解活性を有するタンパク質に関する。

本発明の第1の発明において、d s RNA分解活性を有するタンパク質は、Dicerの機能ドメインを有することが好ましく、例えば、RNase IIIa、bならびにd s RNA結合ドメインからなるものが好ましい。さらに、PAZドメインを含んでいても良い。また、本発明の第1の発明のタンパク質を用いることにより、特定の長さのd s RNAが約15～30塩基対のd s RNAを生成させることができる。また本発明の第1の発明のタンパク質としては、d s RNA分解活性を有するタンパク質が配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質が例示される。あるいは、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、本発明の第1の発明のd s RNA分解活性を有するタンパク質は、コドンを宿主での発現に適したものに変換することによって、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用する

ことによって効率よく製造することができる。

また、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることができる。さらに本発明の第1の発明のタンパク質は、コンポーネントとしてキットに含有させることができる。

【0010】

本発明の第2の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でdsRNAにdsRNA分解活性を有するタンパク質を作らせ、特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNAの分解方法に関する。

本発明の第2の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、核酸結合活性を有するタンパク質は、RNA結合活性を有するタンパク質であっても良い。当該RNA結合活性を有するタンパク質は、コールドショックプロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガマリティマ由来のコールドショックプロテインBが例示される。

本発明の第2の発明の方法により、特定の長さのdsRNAが、約15～30塩基対のdsRNAを生成することができる。さらに、本発明の第2の発明において、dsRNA分解活性を有するタンパク質は、本発明の第1の発明のタンパク質であっても良いし、天然型Dicerあるいはその機能的同等物であっても良い。

【0011】

本発明の第3の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でRNA合成活性を有するタンパク質を用いてRNA合成反応を行うことを特徴とするRNAの合成方法に関する。

本発明の第3の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、当該核酸結合活性を有するタンパク質は、コールドショックプロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガマリティマ由来のコールドショックプロテインBが例示される。さらに、RNA合成活性を有するタンパク質はDNA依存性RNAポリメラーゼであってもよい。

【0012】

本発明の第4の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びにdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

【0013】

本発明の第5の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

【0014】

本発明の第6の発明は、本発明の第3の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

【0015】

本発明の第7の発明は、本発明の第3の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、特定の長さのdsRNAを調製できるdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。さらに本発明により、RNA干渉等に利用できる特定の長さのdsRNAを効率よく生成させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本明細書においてDicerとは、RNAiの初期段階で長鎖のdsRNAをsiRNAにプロセッシングできる機能を有するタンパク質のことと言う。天然型のDicerとしては、とくに限定はされないが例えばN末端側よりATP結合ドメイン、RNAヘリカーゼドメイン、機能未知なPAZドメイン、RNaseIIIa及びbドメイン、さらにdsRNA結合ドメインから構成されているものが挙げられる。

【0018】

本明細書において、Dicerの機能ドメインとは、長鎖dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成できる活性に関与する領域をコードする部位のことと言う。

【0019】

上記機能ドメインとしては、特に限定はされないが例えば、RNaseIIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインからなるものが例示される。当該RNaseIIIa、bドメインは、Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885に記載のように、2本鎖RNAに特異的に作用し、5'末端にリン酸基をもつを特定の鎖長のオリゴヌクレオチドを生成させる活性に関与する領域をコードする部位であっても良い。さらに、dsRNA結合ドメインは、2本鎖RNAに特異的に結合する活性をコードする部位であっても良い。

【0020】

本明細書においてdsRNAとは、RNA干渉の対象となるmRNAと該mRNAに相補的な塩基配列を有するRNAとの2本鎖構造を形成したRNAのことと言う。

また、本明細書においてdsRNAの分解反応による生成物の応用例としては、主に以下に示すsiRNAがある。

【0021】

本明細書において特定の長さのdsRNAとは、特に限定はされないが例えば、約10～100塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAのことを言う。さらに、約15～30塩基対の範囲中の特定の長さ、特に20～25塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAであっても良い。これらのdsRNAは、siRNAとして使用できる。

【0022】

本明細書において核酸結合活性を有するタンパク質とは、一本鎖または二本鎖のDNA、RNAに結合する活性を有するタンパク質のことを言う。当該タンパク質としては、核酸の二次構造を解消する機能を有するものが好ましく、例えば、DNAヘリカーゼ、RNAヘリカーゼあるいはその機能的同等物が挙げられる。

【0023】

本明細書において低温誘導性ベクターとは、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターのことを言い、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCo1d系ベクターが挙げられる。

【0024】

本明細書においてコールドショックプロテインとは、本来の生育条件よりも低温になるような状況下でその温度低下により刺激されて発現されるタンパク質の総称を言う。

【0025】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質、該タンパク質の製造方法ならびに該タンパク質を含有するキット

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成することができる。当該dsRNA分解活性を有するタンパク質としては、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば特に限定ではなく、例えば、Dicerの機能ドメインを有するタンパク質が例示される。当該Dicerの機能ドメインは、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質であっても良い。また、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば、そのタンパク質の由来は問わない。

当該RNase IIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインは、特に限定はされないが例えばヒト由来Dicerの場合、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列のN末端側のアミノ酸1271～1924（配列表の配列番号2記載の塩基配列番号3811～5772）を有するものが挙げられる。例えば、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）あるいは配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号13記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）が例示される。

【0026】

さらに本発明のタンパク質においては、PAZドメインを含有していても良く、特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号17記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）あるいは配列表の配列番号18記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号19記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）が例示される。

また、本発明においてRNase IIIドメインにさらにPAZドメインを含むことにより当該タンパク質は、酵素としての安定性を高めることできる。特に限定はされないが、例えば凍結融解における安定性等が挙げられる。

【0027】

本発明のタンパク質は、特に限定はされないが例えば、長鎖dsRNAを分解し、RNA干渉に有効なsiRNAを生成させることができる。

また、上記機能を有する範囲であれば上記アミノ酸配列あるいは塩基配列において、ないしは複数個のアミノ酸あるいは塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加されたものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。

特に限定はされないが、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列（例えば、Perfector DB配列等）、発現タンパク質精製用のタグ配列（例えば、Histag配列等）、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列（例えば、Factor Xa配列等）などのアミノ酸配列を付加したものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12又は18記載のアミノ酸配列を有するdsRNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、長鎖のdsRNAを特定の長さのdsRNAにすることができる。すなわち、本発明においては使用するdsRNA分解活性を有するタンパク質を選択することにより、所望の特定の長さのdsRNAを調製することができる。当該特定の長さのdsRNAは、特に限定はされないが例えば、約10～100塩基対の範囲、好ましくは約15～30塩基対の範囲、特に好ましくは約20～25塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAが例示される。

さらに、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えばDicer変異体は、pH8.5以上のトリス-塩酸緩衝液中で塩化マグネシウムの存在下で保存することにより、4℃保存ならびに-20℃保存のいずれの場合においてもその活性を長期間安定に保持することができる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、下記(2)に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態であっても良い。特に限定はされないが、上記Dicer変異体と核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質が例示される。

【0028】

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するための方法としては、コドンを宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強すること

を含む方法であっても良い。特に限定はされないが例えば、発現遺伝子のコドン改変を含む製造方法であってもよく、当該タンパク質のアミノ酸配列の一部又は全てをタンパク発現の至適のコドン状態に変換したもの、もしくはそれに準じる状態の宿主を用いて発現させることができる。前記至適のコドン状態、もしくはそれに準じる状態の宿主としては、特に限定はされないが例えば、特定のコドンを認識するtRNA量を遺伝子工学的に通常この細胞中で産生する量よりも数倍以上高めた宿主が例示される。当該宿主としては、大腸菌が例示され、例えばアルギニンのコドン(AGA、AGG)のtRNAを補充した大腸菌、さらにイソロイシン(AUA)、プロリン(CCC)、ロイシン(CUA)のtRNAを補充した大腸菌等が挙げられる。

さらに、コドン改変を行って、宿主中での目的のタンパク質の発現を向上させる方法を用いても良く、その際にmRNAの2次構造を考慮にいれても良い。

すなわち、発現遺伝子のコドン変換、補強等によりタンパク発現が向上するような方法であれば特に限定はされない。

【0029】

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するためのベクターには、特に限定はなく、市販のベクター、発現系のいずれもが使用できる。特に、限定はされないが例えばpETシステム(ノバジェン社製)を用いることができる。さらに、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターが好適に使用でき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

本発明の製造方法の一態様としては、上記Dicer変異体を低温で機能し得るプロモーターを有するベクター、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターで製造する方法が例示される。

すなわち、本発明の製造方法においては、特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を保持できるタンパク質を発現できるベクターであればいずれもが好適に使用できる。

また、当該特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を最終的に保持できるタンパク質を得られるならば、タンパク発現時は封入体の形態であるがその後のリホールディング操作により当該機能を回復できるものを発現できるベクターも含まれる。

本発明の方法の一態様、例えば上記Dicer変異体を製造する場合においては、従来のヒト由来Dicerの全長を発現させた場合に比較して、生産量が向上し、さらに当該タンパク質の活性保持体の取得率も向上させることができる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法においては、下記(2)に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態で発現させる方法も含まれる。

【0030】

(2) 本発明の核酸結合活性を有するタンパク質によるdsRNAの分解の促進方法並びに当該タンパク質を用いたRNA合成促進方法

本発明の特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNA分解の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパクとしては、結果的にdsRNA分解活性を促進するものであれば特に限定はなく、例えば、上記RNA結合活性を有するタンパク質等が好適に使用できる。

当該RNA結合活性を有するタンパク質としては特に限定はないが、コールドショックプロテイン(Csp:cold shock protein)が例示される。特に常温域で機能し得るコールドショックプロテインが好適に使用でき、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールドショックプロテインが好ましい。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号10記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列)を有するサーモトガマリティマ(Thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質が好適に使用できる。

当該CspBタンパク質をdsRNA分解活性を有するタンパク質と組み合わせることにより、当該dsRNA分解活性を促進させることができる。さらに本発明の方法は、上記(1)記載の特定の長さのdsRNAを生成させるdsRNA分解活性を有するタンパ

ク質、例えばDicer変異体、天然型Dicerあるいは市販のリコンビナントDicerのような機能的同等物のいずれにおいてもその特定の長さのdsRNAを生成させる活性を促進できる。

さらに、本発明の方法においては、当該核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA合成活性を有するタンパク質は、dsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態のものであってもよい。

【0031】

一方、本発明のRNA合成の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下にを行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパクとしては、結果的にRNA合成活性を有するタンパク質のRNA合成活性を促進するものであれば特に限定はなく、核酸結合活性を有するタンパク質、コールドショックプロテイン(Csp:cold shock protein)が好適に使用できる。当該コールドショックプロテインは、特に限定はされないが好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のものが好適に使用できる。当該コールドショックプロテインとしては特に限定はされないが、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号10記載の塩基配列)を有するサーモトガマリティマ(The thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質が例示される。

当該CspBタンパク質をRNA合成系に共存させることにより、例えばRNAポリメラーゼのRNA合成活性を促進させることができる。当該タンパク質は、生成物が一本鎖あるいは二本鎖RNAのいずれの場合においても、その合成活性を促進することができる。

【0032】

さらに、本発明のRNA合成の促進方法は、長鎖dsRNAのみならず、短鎖dsRNA、例えばsiRNAの合成に利用することができる。当該siRNA合成においては、特に限定はされないがT7 RNAポリメラーゼ等を用いて、好ましくは約15~30塩基対、特に好ましくは約20~25塩基対のものを合成する際に利用できる。

【0033】

さらに本発明の方法においては、核酸結合活性を有するタンパク質がRNA合成活性を有するタンパク質によるdsRNAの合成ならびにdsRNA分解活性を有するタンパク質のdsRNA分解の二つの反応を促進するため、特にRNA干渉において重要なdsRNAの合成ならびにsiRNAの生成系に利用することができる。この場合、各タンパク質は別個であってもよいし、融合タンパク質の形態であってもよい。

【0034】

(3) 本発明の方法に使用される組成物

本発明の組成物は、特定の長さのdsRNAに分解する反応及び/又はRNAの合成反応を効率よく行うための組成物である。

当該組成物は、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールドショックプロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールドショックプロテイン(Csp:cold shock protein)が好適に使用でき、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号10記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列)を有するサーモトガマリティマ(The thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質が好ましい。

【0035】

本発明の組成物には、dsRNA分解活性を有するタンパク質及び/又はRNA合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質としては、Dicerの機能ドメインを有するものが好ましく、例えば、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質が好適に使用できる。特に限定はされないが例えば、上記(1)記載のDicer変異体、天然型Dicerあるいは、市販のリコンビナントDicerのような機能的同等物のいずれであっても良い。当該Dicer変異体を含む組成物としては、配列表の配

列番号4又は17記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。また、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。

上記d s RNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列（例えば、Perfect DB配列等）、発現タンパク質精製用のタグ配列（例えば、His tag配列等）、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列（例えば、Factor Xa配列等）などのアミノ酸配列を付加したタンパク質であってもよい。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12又は18記載のアミノ酸配列を有するd s RNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。さらに、本発明の組成物には、上記（1）記載のDicer変異体を安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

【0036】

さらに、RNA合成活性を有するタンパク質としては、例えばT7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ等が好適に使用できる。

さらに本発明の組成物の別態様としては、上記（2）記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質と特定の長さのd s RNAを生成し得るd s RNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

本発明の組成物は、特定の長さのd s RNAへの効率の良い分解及び／又は一本鎖あるいは2本鎖RNAの合成反応を簡便に行なうことができる。

【0037】

また、本発明の組成物の一態様としては、長鎖d s RNAのみならず、短鎖d s RNA、例えばs i RNAの合成に利用することができる組成物が挙げられる。当該組成物は、約10～100塩基対、好ましくは約15～30塩基対、特に好ましくは約20～25塩基対のd s RNAを合成する際に有効である。

【0038】

（4）本発明の方法に使用されるキット

本発明の方法に使用されるキットは、特定の長さのd s RNAに分解する反応及び／又はRNAの合成反応を効率よく行なうためのキットである。

当該キットは、上記（2）記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールドショックプロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールドショックプロテイン（Csp:cold shock protein）が好適に使用でき、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列を有するサーモトガマリティマ（Thermotoga maritima）由来のCspBタンパク質が好適に使用できる。

【0039】

本発明のキットには、特定の長さのd s RNAを生成する活性を有する、d s RNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。該d s RNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活性を有するタンパク質としては、上記（3）で挙げられたものが好適に使用できる。さらに、本発明のキットには、上記（1）記載のDicer変異体を安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

さらに本発明のキットの別態様としては、上記（2）記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質と特定の長さのd s RNAを生成し得るd s RNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

さらに、本発明のキットには、上記以外のコンポーネント、例えば反応の結果生成された特定の長さのd s RNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。特に限定はされないが例えば、約21塩基対のs i RNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。

本発明のキットを用いることで、特定の長さのd s RNAへの効率の良い分解及び/又はRNAの合成を簡便に行なうことができる。

【0040】

また本発明のキットの一態様としては、長鎖d s RNAのみならず、短鎖d s RNA、例えばs i RNAの合成に利用することができるキットが挙げられる。当該キットは、約10~100塩基対、好ましくは約15~30塩基対、特に好ましくは約20~25塩基対のd s RNAを合成する際に有効である。

【実施例】

【0041】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については2001年、コールドスプリングハーバー ラボラトリー発行、T.マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラークローニング：アラボラトリー マニュアル第3版 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual 3rd ed.) に記載の方法によった。

【0042】

実施例1 ヒト由来DicerのRNase IIIドメインの発現

(1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号1記載のヒト由来Dicer アミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸1271~1924(塩基番号3811~5772)よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号5及び6記載の塩基配列を有する合成プライマー1及び2をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー1は、制限酵素Kpn Iの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1271~1277に相当する塩基配列を塩基番号16~36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー2は、制限酵素Hind IIIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1919~1924に相当する塩基配列を塩基番号18~36にもつ。

【0043】

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、鑄型DNA(ヒトcDNAライブラリー、Human Pancreas、タカラバイオ社製)2μl、5μlの10×LA PCR buffer(タカラバイオ社製)、5μlのdNTP混合液(タカラバイオ社製)、10pmolの合成プライマー1、10pmolの合成プライマー2、0.5UのTakara LA Taq(タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を50μlとした。前記反応液をTakara PCR Thermal Cycler SP(タカラバイオ社製)にセットし、94℃1分、55℃1分、72℃3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

【0044】

反応終了後、該反応液5μlを1.0%アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約2kbのDNAフラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを5μlの滅菌水に懸濁し、制限酵素Kpn I(タカラバイオ社製)及び制限酵素Hind III(タカラバイオ社製)で2重消化し、1.0%アガロース電気泳動によりそのKpn I-Hind III消化物を抽出精製

し、KpnI-HindIII消化DNA断片を得た。

【0045】

次に国際公開第99/27117号パンフレットの実施例1～6記載の方法に従い、p Col d 08 NC 2ベクターを調製した。

次に上記p Col d 08ベクターを上記KpnI-HindIII消化DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記KpnI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20μlを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50μg/ml含む）上で生育させた。

【0046】

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シークエンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドをp Col d 08 hDi-Rとした。当該プラスミドは、p 1asmid p Col d 08 hDi-Rと命名、表示され、平成15年8月11日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566））にFERM P-19482として寄託されている。このp Col d 08 hDi-Rは、ヒト由来Dicer アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸番号1271～1924のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB配列、Histag配列、並びにFactor Xa配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号12に、塩基配列を配列表の配列番号13に示す。

【0047】

(2) 発現、精製及び各種buffer条件でのサンプル調製

上記(1)で調製したp Col d 08 hDi-Rを用いて大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50μg/ml含む）上で生育させた。生育したコロニーを2.5mlのLB液体培地（アンピシリン50μg/ml含む）に植菌し、37℃で一晩培養した。この一部を100mlの同LB培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃に保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5mlの細胞破碎溶液[50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、1% Triton X-100、1mM ジチオスレイトール、2mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離(11,000rpm 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

【0048】

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして1ml分のNi-NTA agarose（キアゲン社製）にbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Triton X-100]を10ml添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約5mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂をφ15mmのカラムに充填し、5mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5mlのbuffer B [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Triton X-100、40mM イミダゾール]で樹脂を洗浄後、5mlのbuffer C [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Triton

X-100、40mM イミダゾール]、続いて5mlのbufferBで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

【0049】

洗浄後、3mlのbufferD [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、500mlのbufferE [50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール]で透析を行ない、その後、セントリコン(アミコン社製)を用いて約10倍まで濃縮を行なった。この精製濃縮サンプルの一部について10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、分子量約76,800のところに目的タンパク質のバンドが確認された。さらに、当該サンプルについてAnti His HRP Conjugate(キアゲン社製)を用い、その添付プロトコルに従って抗Hisタグ抗体を用いたウエスタンプローティング検出を行なったところ、目的のタンパク質バンドが発色検出された。

【0050】

さらに上記方法ではbufferDでの溶出後、bufferE(これをタンパク質サンプルIとする)で透析を行なっているが、タンパク形状緩衝液の条件設定のため、以下の組成の緩衝液での透析も同様にして実施した。

1：bufferFを用いた透析 [50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルII

2：bufferGを用いた透析 [50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルIII

3：bufferHを用いた透析 [50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.8)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルIV

【0051】

実施例2 dsRNA分解活性の測定

(1) 反応液の調製

上記実施例1-(2)で調製したタンパク質サンプルI～IVについてそのDicer活性を測定した。当該活性測定は以下のようにして行った。

まず、活性測定に用いた基質となるdsRNAは、Turboscript T7 Transcription kit(GTS社製)を用いて、その添付プロトコルに従つて合成した。

すなわち、プラスミドpQBI125(Quantum Biotechnologies Inc.社製)に挿入されているRed-shift Green Fluorescent Protein(以下 GFPと略称する)をコードする遺伝子(配列表の配列番号11)について、プラスミドpDON-AI(タカラバイオ社製)に挿入したpDON-rsGFPを鋳型とし、配列表の配列番号7記載のT7プロモーター配列をもった合成プライマー3と配列表の配列番号8記載の合成プライマー4を用いてPCRを行い、増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNA polymerase(タカラバイオ社製)によるRNA合成反応により約700bpの長さのdsRNAを調製した。

【0052】

上記方法で調製したdsRNA 1μg、上記(2)で調製したタンパク質サンプル1μl、10mM ATP溶液1μl、50mM 塩化マグネシウム溶液1μl、5×反応緩衝液(それぞれ最終透析に用いた緩衝液の5倍濃縮したもの)2μl、これにnuclease free水を加えて、全量を10μlとしたものを反応液とした。

【0053】

また、市販のDicer (GTS社製) の場合は、Dicer酵素液 $2\mu l$ 、基質となるdsRNA $1\mu g$ 、 10mM ATP溶液 $1\mu l$ 、 50mM 塩化マグネシウム溶液 $0.5\mu l$ 、付属の反応緩衝液 $4\mu l$ 、これにnuclease free水を加えて、全量を $10\mu l$ としたものを反応液とした。

【0054】

以上の反応液を調製し、 37°C で 17 時間反応後、 $5\mu l$ を 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムプロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。電気泳動後にエチジウムプロマイド染色したゲルより、約 21 ヌクレオチドの分解産物の確認されたものを活性有とした。

【0055】

(2) 活性測定

上記(1)で調製した反応液の活性測定を行い、RNase IIIドメインタンパク質への影響を検討した。さらに、各緩衝液中における安定性についても検討するため、精製直後のサンプルを用いた場合と、 4°C 及び -20°C 条件で 5 日間保存したサンプルを用いた。その結果、特にタンパク質サンプルIII、タンパク質サンプルIVにおいては、 4°C 保存ならびに -20°C 保存のいずれの場合においても市販Dicerと同じ大きさの約 21 ヌクレオチドの分解産物が確認され、その活性を安定に保持していることが確認できた。

【0056】

以上のことから、ヒト由来DicerのRNase IIIドメインタンパク質は、pH 8.5 以上のトリス-塩酸緩衝液中、塩化マグネシウムが存在する条件で保存することで活性を安定化できることが判明した。

【0057】

実施例3 dsRNA生産及び分解に寄与する因子の検討

(1) dsRNA生産及び分解に寄与する因子を検討するために、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質について検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質は入手が困難であった。従って、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ・マリティマ (Thermotoga maritima) 由来のCspBタンパク質をモデルタンパク質として用いた。当該タンパク質は、プロテインサイエンス (Protein Science) 第8巻、394-403頁 (1999) 記載の方法で調製した。

【0058】

(2) サーモトガ・マリティマ由来CspBのdsRNA分解への効果

CspBを添加した形でのdsRNA分解活性は以下のように測定した。

すなわち、hDi-Rを酵素として用いた場合、実施例1-(2)で調製したタンパク質サンプル(酵素液) $1\mu l$ 、上記(1)で調製したCspB溶液 $1\mu l$ 、基質となるdsRNA $1\mu g$ 、 10mM ATP溶液 $1\mu l$ 、 50mM 塩化マグネシウム溶液 $1\mu l$ 、 $5\times$ 反応緩衝液 [250mM トリス-塩酸 (pH 8.5)、 500mM 塩化ナトリウム、 0.5% Triton X-100、 5mM DTT] $2\mu l$ 、これにnuclease free水を加えて、容量を $10\mu l$ としたものを反応液とした。また市販のDicer (GTS社製) の場合は、酵素液 $2\mu l$ 、CspB溶液 $1\mu l$ 、基質となるdsRNA $1\mu g$ 、 10mM ATP溶液 $1\mu l$ 、 50mM 塩化マグネシウム溶液 $0.5\mu l$ 、付属の反応緩衝液 $4\mu l$ 、これにnuclease free水を加えて、容量を $10\mu l$ としたものを反応液とした。

【0059】

添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で $9.2\text{ng}/\mu l$ 、 $18.4\text{ng}/\mu l$ 、 $92\text{ng}/\mu l$ になるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を $1\mu l$ 添加した。

【0060】

以上の反応液を調製し、 37°C で 17 時間反応後、 $5\mu l$ を 15% ポリアクリルアミド

電気泳動に供し、エチジウムプロマイドによる染色を行い分解産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Non linear Dynamics社製)による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。その結果、市販Dicer及びRNase IIIドメインタンパク質のいずれの場合においてもCspB添加によるdsRNAの分解量の向上が確認できた。特に9.2 ng/μlの前後で分解量が向上することが確認できた。

【0061】

すなわち、CspBを反応液中に添加することで、市販のDicer、RNase IIIドメインタンパク質のいずれにおいてもdsRNA分解産物がより多く得られることが明らかとなった。

【0062】

(3) サーモトガ・マリティマ由来CspBのRNA合成への効果

RNAiにおいては、dsRNAを合成するためにRNA合成系の活性を促進することも重要であるとの見地に基づき、サーモトガ・マリティマ由来CspBのRNA合成への効果を検討した。モデル系として、T7 RNAポリメラーゼ系を選択した。RNA合成系への影響については以下のようにして行った。すなわち、CspBを添加した形でのT7 RNAポリメラーゼによる転写量を目安とした。常法により調製したT7プロモーターを有するpET16b (ノバジェン社製) に配列表の配列番号11記載の塩基配列を有するrsGFP遺伝子を導入したプラスミドを鋳型DNAとして1 μg、10×T7 RNAポリメラーゼ用緩衝液 (タカラバイオ社製) 2 μl、50 mM DTT 2 μl、RNaseインヒビター (タカラバイオ社製) 0.4 μl、25 mM NTP 2 μl、T7 RNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製) 1 μl、CspB溶液 1 μl、これにnuclease free水を加えて容量を20 μlとしたものを反応液とし、37℃で4時間反応させた。なお本実施例でCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/μl、180 ng/μl、460 ng/μl、920 ng/μlになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を1 μl 添加した。

反応後のサンプル2 μlに、10×MOPS緩衝液 (200 mM MOPS、50 mM 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA、10 mM EGTA) 2 μl、ホルムアルdehyド 2 μl、脱イオン化ホルムアミド 9 μl 及びnuclease free水 3 μl を添加して70℃、10分間保温し、その後水中で1分間インキュベートした。これに10×loading buffer 2 μl を添加して、1×MOPS緩衝液中でエチジウムプロマイドを含む1.25%アガロースゲルを用いて電気泳動解析を行なった。そのゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Non linear Dynamics社製) による画像解析によって、T7 RNAポリメラーゼによって合成されたmRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が460 ng/μl以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上に、さらに920 ng/μl添加した場合は約3倍になることが確認できた。

【0063】

(4) サーモトガ・マリティマ由来CspBのdsRNA合成への効果

次にサーモトガ・マリティマ由来CspBのdsRNA合成に対する影響について検討した。本実施例においては、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鋳型を利用した。RNAへの転写については、市販のTurboScript T7 Transcription kit (ジーンセラピーシステムズ社製) を用いて、その添付プロトコルに従った。なお、この際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/μl、180 ng/μl、460 ng/μl、920 ng/μlになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を1 μl 添加した。37℃、4時間反応後に1 μl のDNase Iを添加し、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1 μl をエチジウムプロマイドで染色して電気泳動を行なった。

ドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルを上記(3)と同様の方法でT₇ RNAポリメラーゼによって合成されたdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920ng/μl以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上なることが確認できた。

【0064】

上記実施例と同様に別態様のT₇ RNAポリメラーゼ転写系についても検討した。すなわち、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鑄型1μg、10×T₇ RNAポリメラーゼ緩衝液(タカラバイオ社製)1μl、50mM DTT 1μl、RNase inhibitor(タカラバイオ社製)0.2μl、25mM NTP 1μl、T₇ RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)0.5μl、CspB溶液1μl、これにnuclease free水を加えて容量を10μlとしたものを反応液とし、37℃で4時間反応させた。なおこの際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90ng/μl、180ng/μl、460ng/μl、920ng/μlになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1μl添加した。反応後のサンプルにDNase I(タカラバイオ社製)を0.5μl加えて、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1μlをエチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルについてもdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920ng/μl以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約3倍以上なることが確認できた。

【0065】

以上のように、CspBを反応液中に添加することで、T₇ RNAポリメラーゼによる転写産物がより多く得られることが明らかとなった。この効果は、1本鎖RNA合成ならびに2本鎖RNA合成のいずれの場合においても確認できた。

【0066】

実施例4 ヒト由来DicerのPAZ+RNase IIIドメインの発現

(1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号1記載のヒト由来Dicer アミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸679～1924(塩基番号2035～5772)よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号14及び15記載の塩基配列を有する合成プライマー5及び6をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー5は、制限酵素KpnIの認識配列を塩基番号9～14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号679～685に相当する塩基配列を塩基番号16～36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー6は、制限酵素 HindIIIの認識配列を塩基番号9～14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1919～1924に相当する塩基配列を塩基番号18～35にもつ。

【0067】

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、鑄型DNA(ヒトcDNAライブラリー、Human Pancreas、タカラバイオ社製)2μl、5μlの10×LA PCR buffer(タカラバイオ社製)、5μlのdNTP混合液(タカラバイオ社製)、10pmolの合成プライマー5、10pmolの合成プライマー6、0.5UのTakara LA Taq(タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を50μlとした。前記反応液をTakara PCR Thermal Cycler SP(タカラバイオ社製)にセットし、94℃1分、55℃1分、72℃3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

【0068】

反応終了後、該反応液 5 μl を 1. 0 % アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約 2. 7 k b p の DNA フラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収 DNA を 5 μl の滅菌水に懸濁し、制限酵素 Kpn I (タカラバイオ社製) 及び制限酵素 Hind III (タカラバイオ社製) で 2 重消化し、1. 0 % アガロース電気泳動によりその Kpn I - Hind III 消化物を抽出精製し、Kpn I - Hind III 消化 DNA 断片を得た。

【0069】

次に実施例 1-(1) で調製した p Col d 08 NC 2 ベクターを上記 Kpn I - Hind III 消化 DNA 断片断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記 Kpn I - Hind III 消化 DNA 断片と混合し、DNA ライゲーションキット (タカラバイオ社製) を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液 20 μl を用いて大腸菌 JM109 を形質転換し、その形質転換体を 1. 5 % (w/v) 濃度の寒天を含む LB 培地 (アンピシリン 50 μg/ml 含む) 上で生育させた。

【0070】

目的の DNA 断片が挿入されたプラスミドは、シークエンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドを p Col d 08 hDi-ASI とした。当該プラスミドは、plasmid p Col d 08 hDi-ASI と命名、表示され、平成 15 年 9 月 26 日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566)) に FERM P-1953 6 として寄託されている。この p Col d 08 hDi-ASI は、ヒト由来 Dicer アミノ酸配列 (配列番号 1) のアミノ酸番号 679~1924 のアミノ酸配列をコードする塩基配列 (配列表の配列番号 16 記載の塩基配列、配列番号 17 記載のアミノ酸配列) を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB 配列、His tag 配列、並びに Factor Xa 配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号 18 に、塩基配列を配列表の配列番号 19 に示す。

【0071】

(2) 発現、精製

上記 (1) で調製した p Col d 08 hDi-ASI を用いて大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL strain (ストラタジーン社製)、及び大腸菌 BL21 を形質転換し、それぞれその形質転換体を 1. 5 % (w/v) 濃度の寒天を含む LB 培地 (アンピシリン 50 μg/ml 含む) 上で生育させた。生育したコロニーを 2. 5 ml の LB 液体培地 (アンピシリン 50 μg/ml 含む) に植菌し、37℃ で一晩培養した。この一部を 100 ml の同 LB 培地に植菌し、37℃ で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃ に保温したインキュベーター内で 10 分間振とうした後、IPTG を終濃度 1. 0 mM になるように添加し、そのまま 15℃ で 24 時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5 ml の細胞破碎溶液 [50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8. 5)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0. 1% トライトン X-100、1 mM ジチオスレイトール、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド] に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離 (11,000 rpm 20 分) により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

【0072】

上記上清の抽出液 約 5 ml を用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして 1 ml 分の Ni-NTA agarose (キアゲン社製) に buffer A [20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8. 5)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、1 mM 塩化マグネシウム、0. 1% トライトン X-100] を 10 ml 添加し、混和後、1,500 rpm で数分間遠心し、上清を廃棄して、約 1 ml の樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約 5 ml の上清を添加し

、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂をφ15mmのカラムに充填し、5mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5mlのbuffer B [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]で樹脂を洗浄後、5mlのbuffer C [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]、続いて5mlのbuffer Bで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

【0073】

洗浄後、3mlのbuffer D [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、500mlのbuffer E [50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール]で透析を行ない、その後、セントリコン(アミコン社製)を用いて約10倍まで濃縮を行なった。その一部について10%SDSポリアクリルアミド電気泳動に供したところ、大腸菌BL21-CodonPlus-RIL strain(ストラタジーン社製)を宿主として用いたサンプルで分子量約144,000のところに目的タンパク質のバンドが確認され、これを以下の活性の確認に使用した。一方、宿主がBL21の場合は、目的タンパク質のバンドは確認できなかった。

【0074】

(3) dsRNA分解活性の測定

上記実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプルについて、実施例2記載の方法でそのdsRNA分解活性を測定した。

その結果、電気泳動後にエチジウムプロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物が確認され、RNase IIIドメインタンパク質とPAZ領域を含むタンパク質においてもdsRNA分解活性が確認された。

【0075】

さらに、凍結・融解における安定性についても検討するため、-80℃条件で上記タンパク質サンプルを凍結、その後、室温で融解させるという操作を6回、及び10回繰り返した。また、コントロールとして実施例1-(2)で調製したRNase IIIドメインタンパク質についても同様の検討を行った。

その結果、PAZ+RNase IIIドメインタンパク質の場合、凍結・融解を6回、10回繰り返しても分解活性を保持していた。一方、RNase IIIドメインタンパク質については6回の凍結・融解まで活性は確認された。このことから、RNase IIIドメインにさらにPAZドメインを含むことにより当該タンパク質は、より多くの凍結・融解に対する安定性を獲得することが確認できた。

【0076】

(4) 分解に寄与する因子についての検討

上記実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプルについて、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質の影響を検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質としては、上記実施例3で調製したサーモトガマリティマ由来のCspBタンパク質を用いた。また、dsRNA分解への効果については、以下のように測定した。

すなわち、実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプル(酵素液)1μl、実施例3で調製したCspB溶液1μl、基質となるdsRNA 1μg、10mM ATP溶液1μl、50mM 塩化マグネシウム溶液1μl、5×反応緩衝液[250mM トリス-塩酸(pH8.5)、750mM 塩化ナトリウム、0.5%トライトンX-100、5mM DTT]を2μl、これにnuclease free水を加えて、容

量を $10\mu l$ としたものを反応液とした。CspBタンパク質の濃度は終濃度で $9.2\text{ ng}/\mu l$ 、 $18.4\text{ ng}/\mu l$ 、 $92\text{ ng}/\mu l$ になるよう添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である 10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)を $1\mu l$ 添加した。

以上の反応液を調製し、 37°C で17時間反応後、 $5\mu l$ を 15% ポリアクリルアミド電気泳動に供し、エチジウムプロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。

その結果、PAZ+RNase IIIドメインタンパク質の場合においても、CspB添加によるdsRNAの分解量の向上が確認できた。特に $9.2\text{ ng}/\mu l$ の前後で分解量が向上することが確認できた。

【0077】

すなわち、CspBは、RNase IIIドメインを含む天然型、あるいは変異型のヒト由来DicerのいずれにおいてもそのdsRNA分解活性を促進することが確認できた。

【0078】

実施例5

本発明のヒト由来RNase IIIドメインタンパク質を用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について検討した。対照として、市販のDicer (GTS社) を用いた。dsRNA分解産物の調製は、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載のRNase IIIドメイン酵素並びに市販のDicerを10単位用いて、dsRNA $10\mu g$ 分を、 37°C 、18時間で切断した。これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems社製) を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0079】

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、 $10\% \text{ FBS}$ および $1\% \text{ penicillin/streptomycin}$ を含むD-MEM培地(SIGMA社製)で適量(ceil数： 5×10^4)24well穴プレートにまき、一晩 CO_2 インキュベーター内で培養した。約80%コンフレントになった状態で $50\mu l$ の無血清培地に $3\mu l$ のTransIT 293 Transfection Reagent(タカラバイオ社製)を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、 $0.3\mu g$ のpQB I 25(タカラバイオ社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。そこに上記siRNAを 500 ng 加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置し、これをDNA/siRNA溶液とした。Well中の $10\% \text{ FBS}$ を含むD-MEM培地を $250\mu l$ になるように添加したものに、DNA/siRNA溶液を滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、 $0.3\mu g$ のpQB I 25のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後 CO_2 インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター(DNA)のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表1に示す。

【0080】

【表1】

導入サンプル	平均蛍光強度
コントロール（無添加）	8. 09
コントロール（ベクターのみ）	1331. 44
タンパク質サンプル I II	14. 92
市販Dicer	71. 57

【0081】

表1に示したように、コントロール（ベクターのみ）と比較してその平均蛍光値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、RNase IIIIドメインタンパク質によって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNAi効果を示し、市販Dicerのものよりも強いRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のRNase IIIIドメインタンパク質がRNA干渉ためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0082】

本発明により特定の長さのdsRNAを生成するdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。また、本発明の方法によりRNA干渉等において有用な、特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び／又はRNA合成促進方法が提供される。さらに本発明の特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び／又はRNA合成促進方法を簡便に実施することができる組成物ならびにキットが提供される。

【配列表フリー テキスト】

【0083】

SEQ ID NO:3; A gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:4; An amino acid sequence of human dicer mutant

SEQ ID NO:5; Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:6; Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:7; Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

SEQ ID NO:8; Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

SEQ ID NO:14; Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:15; Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:16; A gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:17; An amino acid sequence of human dicer mutant

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> The protein which has dsRNA decomposition activity, the dsRNA decomposition method and the RNA synthesis method using the protein which has nucleic acid binding activity

<130> T-1855

<160> 19

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1924

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Ser Pro Ala Leu Gln Pro Leu Ser Met Ala Gly Leu Gln Leu
1 5 10 15

Met Thr Pro Ala Ser Ser Pro Met Gly Pro Phe Phe Gly Leu Pro Trp
20 25 30

Gln Gln Glu Ala Ile His Asp Asn Ile Tyr Thr Pro Arg Lys Tyr Gln
35 40 45

Val Glu Leu Leu Glu Ala Ala Leu Asp His Asn Thr Ile Val Cys Leu
50 55 60

Asn Thr Gly Ser Gly Lys Thr Phe Ile Ala Ser Thr Thr Leu Leu Lys
65 70 75 80

Ser Cys Leu Tyr Leu Asp Leu Gly Glu Thr Ser Ala Arg Asn Gly Lys
85 90 95

Arg Thr Val Phe Leu Val Asn Ser Ala Asn Gln Val Ala Gln Gln Val
100 105 110

Ser Ala Val Arg Thr His Ser Asp Leu Lys Val Gly Glu Tyr Ser Asn
 115 120 125

Leu Glu Val Asn Ala Ser Trp Thr Lys Glu Arg Trp Asn Gln Glu Phe
 130 135 140

Thr Lys His Gln Val Leu Ile Met Thr Cys Tyr Val Ala Leu Asn Val
 145 150 155 160

Leu Lys Asn Gly Tyr Leu Ser Leu Ser Asp Ile Asn Leu Leu Val Phe
 165 170 175

Asp Glu Cys His Leu Ala Ile Leu Asp His Pro Tyr Arg Glu Phe Met
 180 185 190

Lys Leu Cys Glu Ile Cys Pro Ser Cys Pro Arg Ile Leu Gly Leu Thr
 195 200 205

Ala Ser Ile Leu Asn Gly Lys Trp Asp Pro Glu Asp Leu Glu Glu Lys
 210 215 220

Phe Gln Lys Leu Glu Lys Ile Leu Lys Ser Asn Ala Glu Thr Ala Thr
 225 230 235 240

Asp Leu Val Val Leu Asp Arg Tyr Thr Ser Gln Pro Cys Glu Ile Val
 245 250 255

Val Asp Cys Gly Pro Phe Thr Asp Arg Ser Gly Leu Tyr Glu Arg Leu
 260 265 270

Leu Met Glu Leu Glu Glu Ala Leu Asn Phe Ile Asn Asp Cys Asn Ile
 275 280 285

Ser Val His Ser Lys Glu Arg Asp Ser Thr Leu Ile Ser Lys Gln Ile
 290 295 300

Leu Ser Asp Cys Arg Ala Val Leu Val Val Leu Gly Pro Trp Cys Ala
 305 310 315 320

Asp Lys Val Ala Gly Met Met Val Arg Glu Leu Gln Lys Tyr Ile Lys
325 330 335

His Glu Gln Glu Glu Leu His Arg Lys Phe Leu Leu Phe Thr Asp Thr
340 345 350

Phe Leu Arg Lys Ile His Ala Leu Cys Glu Glu His Phe Ser Pro Ala
355 360 365

Ser Leu Asp Leu Lys Phe Val Thr Pro Lys Val Ile Lys Leu Leu Glu
370 375 380

Ile Leu Arg Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Arg His Ser Phe Glu Ser Val
385 390 395 400

Glu Trp Tyr Asn Asn Arg Asn Gln Asp Asn Tyr Val Ser Trp Ser Asp
405 410 415

Ser Glu Asp Asp Asp Glu Asp Glu Glu Ile Glu Glu Lys Glu Lys Pro
420 425 430

Glu Thr Asn Phe Pro Ser Pro Phe Thr Asn Ile Leu Cys Gly Ile Ile
435 440 445

Phe Val Glu Arg Arg Tyr Thr Ala Val Val Leu Asn Arg Leu Ile Lys
450 455 460

Glu Ala Gly Lys Gln Asp Pro Glu Leu Ala Tyr Ile Ser Ser Asn Phe
465 470 475 480

Ile Thr Gly His Gly Ile Gly Lys Asn Gln Pro Arg Asn Asn Thr Met
485 490 495

Glu Ala Glu Phe Arg Lys Gln Glu Glu Val Leu Arg Lys Phe Arg Ala
500 505 510

His Glu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Thr Ser Ile Val Glu Glu Gly Val
 515 520 525

Asp Ile Pro Lys Cys Asn Leu Val Val Arg Phe Asp Leu Pro Thr Glu
 530 535 540

Tyr Arg Ser Tyr Val Gln Ser Lys Gly Arg Ala Arg Ala Pro Ile Ser
 545 550 555 560

Asn Tyr Ile Met Leu Ala Asp Thr Asp Lys Ile Lys Ser Phe Glu Glu
 565 570 575

Asp Leu Lys Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Ile Leu Arg Asn Lys Cys
 580 585 590

Ser Lys Ser Val Asp Thr Gly Glu Thr Asp Ile Asp Pro Val Met Asp
 595 600 605

Asp Asp His Val Phe Pro Pro Tyr Val Leu Arg Pro Asp Asp Gly Gly
 610 615 620

Pro Arg Val Thr Ile Asn Thr Ala Ile Gly His Ile Asn Arg Tyr Cys
 625 630 635 640

Ala Arg Leu Pro Ser Asp Pro Phe Thr His Leu Ala Pro Lys Cys Arg
 645 650 655

Thr Arg Glu Leu Pro Asp Gly Thr Phe Tyr Ser Thr Leu Tyr Leu Pro
 660 665 670

Ile Asn Ser Pro Leu Arg Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys
 675 680 685

Val Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu
 690 695 700

His Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu
 705 710 715 720

Thr Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr
725 730 735

Ser Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro
740 745 750

Lys Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln
755 760 765

Pro Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro
770 775 780

Asp Glu Leu Asn Phe Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr
785 790 795 800

Thr Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro
805 810 815

His Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu
820 825 830

Leu Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile
835 840 845

Thr Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys
850 855 860

Pro Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val
865 870 875 880

Leu Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe
885 890 895

Lys Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro
900 905 910

Ser Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp
 915 920 925

Tyr Gln Asp Ala Val Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro
 930 935 940

His Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser
 945 950 955 960

Lys Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr
 965 970 975

Lys Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val
 980 985 990

Asp His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn
 995 1000 1005

Gln Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys
 1010 1015 1020

Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu
 1025 1030 1035

Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala
 1040 1045 1050

Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr
 1055 1060 1065

Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly
 1070 1075 1080

Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe
 1085 1090 1095

Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser
 1100 1105 1110

Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr
 1115 1120 1125

Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr Ser
 1130 1135 1140

Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu
 1145 1150 1155

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp
 1160 1165 1170

Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn
 1175 1180 1185

Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln
 1190 1195 1200

Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser
 1205 1210 1215

Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro
 1220 1225 1230

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn
 1235 1240 1245

Ala Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met
 1250 1255 1260

Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp
 1265 1270 1275

Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly
 1280 1285 1290

Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala
 1295 1300 1305

Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser
 1310 1315 1320

Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro
 1325 1330 1335

Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val
 1340 1345 1350

Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro
 1355 1360 1365

Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp Leu
 1370 1375 1380

Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys
 1385 1390 1395

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly
 1400 1405 1410

Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Ser
 1415 1420 1425

Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp
 1430 1435 1440

Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met
 1445 1450 1455

Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro
 1460 1465 1470

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys
 1475 1480 1485

Ser Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe
1490 1495 1500

Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys
1505 1510 1515

Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser
1520 1525 1530

Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr
1535 1540 1545

Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp
1550 1555 1560

Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu
1565 1570 1575

Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu
1580 1585 1590

Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr
1595 1600 1605

Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser Cys
1610 1615 1620

Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp
1625 1630 1635

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp
1640 1645 1650

His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe
1655 1660 1665

Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala
 1670 1675 1680

Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr
 1685 1690 1695

Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile
 1700 1705 1710

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln
 1715 1720 1725

His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn
 1730 1735 1740

Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys
 1745 1750 1755

Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp
 1760 1765 1770

Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp
 1775 1780 1785

Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp
 1790 1795 1800

Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala
 1805 1810 1815

Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp
 1820 1825 1830

Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser
 1835 1840 1845

Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu
 1850 1855 1860

Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly
1865 1870 1875

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys
 1880 1885 1890

Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg
1895 1900 1905

Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn
1910 1915 1920

Ser

<210> 2
<211> 5772
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 2
atgaaaagcc ctgccttgca acccctcagc atggcaggcc tgcatcgat gaccctgtc 60
tcctcaccaa tgggtccctt ctttgactg ccatggcaac aagaagcaat tcataataac 120
atttatacgc caagaaaata tcaggttgaa ctgcttgaa cagctctgga tcataataacc 180
atcgtctgtt taaacactgg ctcagggaaag acatttattg ctagtactac tctactaaag 240
agctgtctct atctagatct aggggagact tcagcttagaa atggaaaaag gacggtgttc 300
ttggtaact ctgcaaaccctt gttgctcaa caagtgtcag ctgtcagaac tcattcagat 360
ctcaaggttt gggaaatactc aaaccttagaa gttaaatgcat ctggacaaa agagagatgg 420
aaccaagagt ttactaagca ccaggttctc attatgactt gctatgtcgc cttgaatgtt 480
ttgaaaaatg gttacttatac actgtcagac attaaccttt tgggtttga tgagtgtcat 540
cttgcaatcc tagaccaccc ctatcgagaa tttatgaagc tctgtgaaat ttgtccatca 600
tgtcctcgca ttttgggact aactgcttcc attttaaatg ggaaatggga tccagaggat 660

ttggaagaaa agtttcagaa actagagaaa attcttaaga gtaatgctga aactgcaact	720
gacctgggtgg tcttagacag gtatacttct cagccatgtg agattgtgg ggattgtgga	780
ccatttactg acagaagtgg gctttatgaa agactgctga tggaattaga agaagcactt	840
aatttatca atgattgtaa tatatctgta cattcaaaag aaagagattc tacttaatt	900
tcgaaacaga tactatcaga ctgtcggtcc gtattggtag ttctgggacc ctgggtgtca	960
gataaagtag ctggaatgat ggttaagagaa ctacagaaat acatcaaaca tgagcaagag	1020
gagctgcaca gggaaattttt attgtttaca gacactttcc taaggaaaat acatgcacta	1080
tgtgaagagc acttctcacc tgccctcactt gacctgaaat ttgttaactcc taaagtaatc	1140
aaactgctcg aaatcttacg caaatataaa ccatatgagc gacacagtt tgaaagcggtt	1200
gagtggtata ataatagaaa tcaggataat tatgtgtcat ggagtgattc tgaggatgat	1260
gatgaggatg aagaaattga agaaaaagag aagccagaga caaatttcc ttctcccttt	1320
accaacattt tgtgcggaat tattttgtg gaaagaagat acacagcagt tgtcttaaac	1380
agattgataa aggaagctgg caaacaagat ccagagctgg cttatatcag tagcaatttc	1440
ataactggac atggcattgg gaagaatcag cctcgcaaca acacgatgga agcagaattc	1500
agaaaaacagg aagaggtact taggaattt cgagcacatg agaccaacct gcttattgca	1560
acaagtattt tagaagaggg ttttgatata ccaaatgca acttgggtgg tcgttttgc	1620
ttgcccacag aatatcgatc ctatgttcaa tctaaaggaa gagcaaggc acccatctt	1680
aattatataa ttttagcgga tacagacaaa ataaaaagtt ttgaagaaga cctaaaacc	1740
tacaaagcta ttgaaaagat ctgagaaac aagtgttcca agtcgggtga tactggtgag	1800
actgacattt atcctgtcat ggatgtatgat cacgtttcc caccatatgt gttgaggcct	1860
gacgatggtg gtccacgagt cacaatcaac acggccattt gacacatcaa tagatactgt	1920
gctagattac caagtgtatcc gtttactcat ctatgttccaa aatgcagaac ccgagagtttgc	1980
cctgatggta cattttattt aactctttat ctgccaatta actcacctt tcgagcctcc	2040
attgttggtc caccaatgag ctgtgtacga ttggctgaaa gagttgtcgc tctcatttgc	2100
tgtgagaaac tgcacaaaat tggcgaactg gatgaccatt tgcgttgcactt tggaaagag	2160

actgttaaat atgaagagga gcttgatttgcatgatgaag aagagaccag tgttccagga 2220
agaccagggtt ccacgaaacg aaggcagtgc tacccaaaag caattccaga gtgtttgagg 2280
gatagttatc ccagacctga tcagccctgt tacctgtatg tgataggaat gtttttaact 2340
acacctttac ctgatgaact caactttaga aggcggaaagc tctatcctcc tgaagatacc 2400
acaagatgct ttggaatact gacggccaaa cccataacctc agattccaca ctttcctgtg 2460
tacacacgct ctggagaggt taccatatcc attgagttga agaagtctgg tttcatgttg 2520
tctctacaaa tgcttgagtt gattacaaga cttcaccagt atatattctc acatattctt 2580
cggtttgaaa aacctgcact agaatttaaa cctacagacg ctgattcagc atactgtgtt 2640
ctacctctta atgttgttaa tgactccagc actttggata ttgactttaa attcatggaa 2700
gatattgaga agtctgaagc tcgcataaggc attcccagta caaagtatac aaaagaaaaca 2760
ccctttgttt ttaaattaga agattacca gatgccgtt tcattccaag atatcgcaat 2820
tttgcattcattt ctcattcgatt ttatgttagct gatgtgtaca ctgatcttac cccactcagt 2880
aaatttcctt cccctgagta tgaaactttt gcagaatatt ataaaacaaa gtacaaccctt 2940
gacctaaccatctcaacca gccactgctg gatgtggacc acacatcttc aagacttaat 3000
cttttgacac ctcgacattt gaatcagaag gggaaagcgc ttcccttaag cagtgcgttag 3060
aagagggaaag ccaaattggga aagtctgcag aataaacaga tactggttcc agaactctgt 3120
gctatacatc caattccagc atcactgtgg agaaaaagctg tttgtctccc cagcatactt 3180
tatgccttc actgcctttt gactgcagag gagctaagag cccagactgc cagcgatgct 3240
ggcgtggag tcagatcact tcctgcggat tttagatacc ctaacttaga cttcgggtgg 3300
aaaaaaatcta ttgacagcaa atcttcatc tcaatttcta actcctcttc agctgaaaat 3360
gataattact gtaagcacag cacaattgtc cctgaaaatg ctgcacatca aggtgctaat 3420
agaacctcct ctctagaaaa tcatgaccaa atgtctgtga actgcagaac gttgctcagc 3480
gagtcggctg gtaagctcca cggtgaagtt tcagcagatc ttacagcaat taatggctt 3540
tcttacaatc aaaatctcgc caatggcagt tatgatttag ctaacagaga ctttggccaa 3600
ggaaatcagc taaattacta caagcagggaa ataccctgtc aaccaactac ctcataattcc 3660

attcagaatt tatacagtta cgagaaccag ccccagccca gcgatgaatg tacttcctg	3720
agtaataaat accttgatgg aaatgctaac aaatctacct cagatggaag tcctgtatg	3780
gccgtaatgc ctggtagcagc agacactatt caagtgtca agggcaggat ggattctgag	3840
cagagccctt ctattggta ctcccaagg actcttgcc ccaatcctgg acttattctt	3900
caggcttga ctctgtcaaa cgctagtatgat ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt	3960
ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc acatatctat ttgcactta ccctgatgcg	4020
catgagggcc gccttcata tatgagaagc aaaaaggtca gcaactgtaa tctgtatcgc	4080
cttggaaaaa agaaggact acccagccgc atgggtgtt caatatttga tccccctgtg	4140
aattggcttc ctccctggta ttagttaaat caagacaaaaa gcaacacaga taaatggaa	4200
aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcattgtg gcgaatggca aactggatga ggattacgag	4260
gaggaggatg aggaggagga gagcctgtatg tggaggcgc cgaaggaaga ggctgactat	4320
gaagatgatt tcctggagta ttagttaggaa catatcagat ttatagataa tatgttaatg	4380
gggtcaggag ctttgtaaa gaaaatctct cttttcctt ttcaaccac tgattctgca	4440
tatgaatgga aaatgccaa aaaatcctcc ttagttagta tgccatttc atcagatttt	4500
gaggattttg actacagctc ttggatgca atgtgtatc tggatcttag caaagctgtt	4560
gaagaagatg acttttgtt ggggtctgg aatccatcag aagaaaactg tggtgttgc	4620
acgggaaagc agtccatttc ttacgacttg cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc	4680
atagcggact gtgtggaagc cctgctggc tgctattaa ccagctgtgg ggagaggcgt	4740
gctcagcttt tcctctgttc actggggctg aaggtgctcc cgtaattaa aaggactgat	4800
cggaaaaagg ccctgtgccct tactcgggag aattcaaca gccaacaaaa gaaccttca	4860
gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt tcacgcttt ctgtattgaa agactcgaa	4920
tatggtt tgaagattcc accaagatgt atgtttgatc atccagatgc agataaaaca	4980
ctgaatcacc ttatatcggt gtttggaaat ttggaaaaaaga aaatcaacta cagattcaag	5040
aataaggctt accttctcca ggctttaca catgcctcct accactacaa tactatcact	5100
gattgttacc agcgcttaga attcctggta gatgcgatt tggactacct cataaccaag	5160

caccttatg aagacccgcg gcagcactcc ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc	5220
ctggtaaca acaccatctt tgcatacgctg gctgtaaagt acgactacca caagtacttc	5280
aaagctgtct ctcctgagct cttccatgtc attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag	5340
aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa	5400
gaagaggata ttgaagttcc aaaggccatg gggatattt ttgagtcgct tgctgggtgcc	5460
atttacatgg atagtggat gtcactggag acagtctggc aggtgtacta tcccatgatg	5520
cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaaattt gtaccccggtt cccctgtgcg agaattgctt	5580
gaaatggaac cagaaactgc caaatttagc ccggctgaga gaacttacga cgggaaggc	5640
agagtcactg tggaagtagt aggaaaggaa aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg	5700
attgccaat ctgcagcagc aagaagagcc ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag	5760
gttcccaata gc	5772

<210> 3
 <211> 1962
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> A gene encoding human dicer mutant

caagtgcgtca agggcaggat ggattctgag cagagccctt ctattggta ctcctcaagg	60
actcttggcc ccaatccctgg acttattctt caggcttga ctctgtcaaa cgctagtgtat	120
ggatttaacc tggagcggct taaaatgctt ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc	180
acatatctat tttgcactta ccctgatgctg catgaggccc gcctttcata tatgagaagc	240
aaaaaggta gcaactgtaa tctgtatcgc cttggaaaaa agaaggact acccagccgc	300
atgggttgtt caatatttga tccccctgtg aattggcttc ctcctggta tgttagtaaat	360
caagacaaaa gcaacacaga taaatggaa aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcgtgc	420
gcgaatggca aactggatga ggattacgag gaggaggatg aggaggagga gagcctgatg	480
tggaggctc cgaaggaaga ggctgactat gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa	540

catatcagat ttatagataa tatgttaatg gggtcaggag ctttgtaaa gaaaatctct	600
ctttctccctt tttcaaccac tgattctgca tatgaatgga aaatgcccaa aaaatcctcc	660
ttagtagta tgccatttc atcagattt gaggatttg actacagctc ttggatgca	720
atgtgctatc tggatcctag caaagctgtt gaagaagatg actttgttgt ggggtctgg	780
aatccatcag aagaaaaactg tgggttgac acggaaagc agtccatttc ttacgacttg	840
cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc atagcgact gtgtgaaagc cctgctggc	900
tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggct gctcagctt tcctctgttc actggggctg	960
aagggtgctcc cggttaattaa aaggactgat cgggaaaagg ccctgtgcc tactcggag	1020
aatttcaaca gccaacaaaa gaaccattca gtgagctgt ctgctgctc tgtggccagt	1080
tcacgctctt ctgtattgaa agactcgaa tatggttgtt tgaagattcc accaagatgt	1140
atgttgcatac atccagatgc agataaaaaca ctgaatcacc ttatatcggg gtttggaaat	1200
tttggaaaaga aaatcaacta cagattcaag aataaggctt accttctcca ggctttaca	1260
catgcctcctt accactacaa tactatcact gattgttacc agcgctttaga attcctggga	1320
gatgcgattt tggactacct cataaccaag caccttatg aagacccgcg gcagcactcc	1380
ccgggggtcc tgacagacct gcggcttgcc ctggtaaca acaccatctt tgcattcg	1440
gctgtaaagt acgactacca caagtacttc aaagctgtct ctcctgagct cttccatgtc	1500
attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag	1560
cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa gaagaggata ttgaagttcc aaaggccatg	1620
ggggatattt ttgagtcgct tgctggtgcc attacatgg atagtggat gtcactggag	1680
acagtctggc aggtgtacta tcccattatg cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaaat	1740
gtaccccggtt cccctgtcg agaattgctt gaaatggaac cagaaactgc caaatttagc	1800
ccggctgaga gaacttacga cgggaaggc agagtcactg tggaaagttagt agggaaagggg	1860
aaatttaaag gtgttgcg aagttacagg attgcataat ctgcagcagc aagaagagcc	1920
ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag gttcccaata gc	1962

<211> 654

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant.

<400> 4

Gln	Val	Leu	Lys	Gly	Arg	Met	Asp	Ser	Glu	Gln	Ser	Pro	Ser	Ile	Gly
1															
															15

Tyr	Ser	Ser	Arg	Thr	Leu	Gly	Pro	Asn	Pro	Gly	Leu	Ile	Leu	Gln	Ala
															30
20															25

Leu	Thr	Leu	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu
															45
35															40

Met	Leu	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Lys	His	Ala	Ile	Thr	Thr	Tyr	Leu	Phe
															60
50															55

Cys	Thr	Tyr	Pro	Asp	Ala	His	Glu	Gly	Arg	Leu	Ser	Tyr	Met	Arg	Ser
															80
65															70

Lys	Lys	Val	Ser	Asn	Cys	Asn	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gly	Lys	Lys	Gly	
85															90

Leu	Pro	Ser	Arg	Met	Val	Val	Ser	Ile	Phe	Asp	Pro	Pro	Val	Asn	Trp
															100

Leu	Pro	Pro	Gly	Tyr	Val	Val	Asn	Gln	Asp	Lys	Ser	Asn	Thr	Asp	Lys
															115
															120

Trp	Glu	Lys	Asp	Glu	Met	Thr	Lys	Asp	Cys	Met	Leu	Ala	Asn	Gly	Lys
															130
															135

Leu	Asp	Glu	Asp	Tyr	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Ser	Leu	Met
															145
															150

Trp	Arg	Ala	Pro	Lys	Glu	Glu	Ala	Asp	Tyr	Glu	Asp	Asp	Phe	Leu	Glu

出証特2004-3085904

165

170

175

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser
 180 185 190

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp
 195 200 205

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met
 210 215 220

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala
 225 230 235 240

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val
 245 250 255

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly
 260 265 270

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp
 275 280 285

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr
 290 295 300

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu
 305 310 315 320

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys
 325 330 335

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser
 340 345 350

Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp
 355 360 365

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His
 370 375 380

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn
 385 390 395 400

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu
 405 410 415

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys
 420 425 430

Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile
 435 440 445

Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu
 450 455 460

Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu
 465 470 475 480

Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu
 485 490 495

Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn
 500 505 510

Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu
 515 520 525

Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe
 530 535 540

Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu
 545 550 555 560

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys

出証特2004-3085904

565	570	575
-----	-----	-----

Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met	580	585	590
---	-----	-----	-----

Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly	595	600	605
---	-----	-----	-----

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly	610	615	620
---	-----	-----	-----

Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala	625	630	635	640
---	-----	-----	-----	-----

Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser	645	650
---	-----	-----

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 5
tcgagctcgg taccccaagt gctcaagggc aggatg 36

<210> 6
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 6
tatctagaaa gcttttagct attgggaacc tgagg 36

<210> 7
<211> 42
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 7

ggtaatacg actcactata gggagaatgg ctagcaaagg ag

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 8

ggtaatacg actcactata gggagatcag ttgtacagtt ca

42

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Thermotoga maritima

<400> 9

Met	Arg	Gly	Lys	Val	Lys	Trp	Phe	Asp	Ser	Lys	Gly	Tyr	Gly	Phe
1				5					10				15	

Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Val	His	Trp	Ser	Ala	Ile
			20					25					30		

Glu	Met	Glu	Gly	Phe	Lys	Thr	Leu	Lys	Glu	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Phe
					35			40			45				

Glu	Ile	Gln	Glu	Gly	Lys	Gly	Pro	Gln	Ala	Ala	His	Val	Lys	Val	
					50			55			60				

Val	Glu														
		65													

<210> 10
<211> 198
<212> DNA
<213> Thermotoga maritima

<400> 10
atgagaggaa aggttaagtg gttcgattcc aagaagggct acggattcat cacaaggac 60
gaaggaggag acgtgttcgt acactggtca gccatcgaaa tggaagggtt caaaactctg 120
aaggaaggcc aggtcgtcga gttcgagatt caggaaggca agaaaggccc acaggcagcg 180
cacgtgaaag tagttgag 198

<210> 11
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> A gene encoding red-shifted green fluorescence protein.

<400> 11
atggcttagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaatttagat 60
ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaagggtga tgcaacatac 120
ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaacc tgcctgttcc atggccaaca 180
ctagtcacta ctctgtgcta tggtgttcaa tgctttcaa gatacccgga tcatatgaaa 240
cgccatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300
ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggaaacat tctggacac 420
aaatttggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa aaaaaagaat 480
ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540
gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tcctttacc agacaaccat 600
tacctgtcca cacaatctgc ccttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660
cttcttgagt ttgtaacagc tgctggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga 720

<210> 12

<211> 675
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 12

Met Asn His Lys Val His His His His Ile Glu Gly Arg Asn
1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln
20 25 30

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly
35 40 45

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn
50 55 60

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile
65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu
85 90 95

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu
100 105 110

Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp
115 120 125

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys
130 135 140

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met
145 150 155 160

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Asp Glu Glu

出証特2004-3085904

165

170

175

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn
 195 200 205

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro
 210 215 220

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser
 225 230 240

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr
 245 250 255

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu
 260 265 270

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys
 275 280 285

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu
 290 295 300

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu
 305 310 315 320

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu
 325 330 335

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg
 340 345 350

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys
 355 360 365

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser
 370 375 380

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg
 385 390 395 400

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile
 405 410 415

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn
 420 425 430

Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn
 435 440 445

Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile
 450 455 460

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His
 465 470 475 480

Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr
 485 490 495

Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys
 500 505 510

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe
 515 520 525

Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg
 530 535 540

Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala
 545 550 555 560

Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser

出証特2004-3085904

565

570

575

Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg
 580 585 590

Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg
 595 600 605

Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu
 610 615 620

Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys
 625 630 635 640

Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala
 645 650 655

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val
 660 665 670

Pro Asn Ser
 675

<210> 13

<211> 2025

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 13

atgaatcaca aagtgcata tcatacatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggtt 60

ccccaaagtgc tcaaggccag gatggattct gagcagagcc cttctattgg gtactcctca 120

aggactcttg gccccaatcc tggacttatt cttcaggctt tgactctgtc aaacgcttagt 180

gatggattta acctggagcg gcttgaaatg cttggcgact ctttttaaa gcatgccatc 240

accacatatac tattttgcac ttaccctgtat gcgcattgagg gccgccttc atatatgaga 300

agcaaaaagg tcagcaactg taatctgtat cgccctggaa aaaagaaggg actacccagc	360
cgcattggtgg tgtcaatatt tgcattccct gtgaattggc ttccctctgg ttatgttagta	420
aatcaagaca aaagcaacac agataaatgg gaaaaagatg aaatgacaaa agactgcac	480
ctggcgaatg gcaaactgga tgaggattac gaggaggagg atgaggagga ggagagcctg	540
atgtggaggg ctccgaagga agaggctgac tatgaagatg atttcctgga gtatgatcag	600
gaacatatca gatttataga taatatgtta atgggtcag gagctttgt aaagaaaatc	660
tctcttctc cttttcaac cactgattct gcataatgaaatggcc caaaaaatcc	720
tccttaggta gtatgccatt ttcatcagat tttgaggatt ttgactacag ctcttgggat	780
gcaatgtgct atctggatcc tagcaaagct gttgaagaag atgacttgtt ggtgggttc	840
tggaaatccat cagaagaaaa ctgtgggttt gacacggaa agcagtccat ttcttacgac	900
ttgcacactg agcagtgtat tgctgacaaa agcatagcgg actgtgtgga agccctgctg	960
ggctgctatt taaccagctg tggggagagg gctgctcagc tttcctctg ttcactgggg	1020
ctgaaggtgc tcccgtaat taaaaggact gatcggaaa aggccctgtg ccctactcgg	1080
gagaatttca acagccaaca aaagaacctt tcagtgagct gtgctgctgc ttctgtggcc	1140
agttcacgct cttctgtatt gaaagactcg gaataatggtt gttgaagat tccaccaaga	1200
tgtatgtttg atcatccaga tgcagataaa acactgaatc accttatatc ggggtttgaa	1260
aattttgaaa agaaaatcaa ctacagattc aagaataagg cttaccttct ccaggcttt	1320
acacatgcct cctaccacta caatactatc actgattgtt accagcgctt agaattcctg	1380
ggagatgcga ttttgacta cctcataacc aagcacctt atgaagaccc gcggcagcac	1440
tccccgggg tcctgacaga cctgcggctc gccctggta acaacaccat cttgcacatcg	1500
ctggctgtaa agtacgacta ccacaagtac ttcaaagctg tctctcctga gctcttccat	1560
gtcattgatg acttttgca gtttcagctt gagaagaatg aaatgcaagg aatggattct	1620
gagcttagga gatctgagga ggtatgaagag aaagaagagg atattgaagt tccaaaggcc	1680
atgggggata ttttgagtc gttgcgtgtt gccatttaca tggatagtgg gatgtcactg	1740
gagacagtct ggcagggtgtatcatccatg atgcggccac taatagaaaa gtttctgca	1800

aatgtacccc gttccctgt gcgagaattg cttgaaatgg aaccagaaac tgccaaattt 1860

agcccggtc agagaactta cgacgggaag gtcagagtca ctgtggaagt agtaggaaag 1920

gggaaattta aaggtgttgg tcgaagttac aggattgcc aatctgcagc agcaagaaga 1980

gccctccgaa gcctcaaagc taatcaacct caggttccca atagc 2025

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer mutant

<400> 14

tcgagctcggtt acccgccctc cattgttggt ccacca 36

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer mutant

<400> 15

tatctagaaa gcttttagct attggaaacc tgagg 36

<210> 16

<211> 3741

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 16

gcctccatttgc ttggccacc aatgagctgt gtacgattgg ctgaaagagt tgtcgctctc 60

atttgctgtg agaaactgca caaaattggc gaactggatg accatttgat gccagttggg 120

aaagagactg ttaaatatga agaggagctt gattgcatg atgaagaaga gaccagtgtt 180

ccaggaagac caggttccac gaaacgaagg cagtgttacc caaaagcaat tccagagtgt 240

ttgagggata gttatccag acctgatcag ccctgttacc tgtatgtat aggaatgggtt 300

ttaactacac	cttacctga	tgaactcaac	tttagaaggc	ggaagctcta	tcctcctgaa	360
gataccacaa	gatgcttgg	aatactgacg	gccaaaccca	tacctcagat	tccacacttt	420
cctgtgtaca	cacgctctgg	agaggttacc	atatccattg	agttaagaa	gtctggttc	480
atgttgtctc	tacaaatgct	tgagttgatt	acaagacttc	accagtatat	attctcacat	540
attctcggc	ttgaaaaacc	tgcactagaa	tttaaaccta	cagacgctga	ttcagcatac	600
tgtgttctac	ctcttaatgt	tgttaatgac	tccagcactt	tggatattga	ctttaaattc	660
atggaagata	ttgagaagtc	tgaagctcgc	ataggcattc	ccagtacaaa	gtatacaaaa	720
gaaacaccct	ttgttttaa	attagaagat	taccaagatg	ccgttatcat	tccaagatat	780
cgcaattttg	atcagcctca	tcgattttat	gtagctgatg	tgtacactga	tcttacccc	840
ctcagtaaat	ttcctcccc	tgagtatgaa	actttgcag	aatattataa	aacaaagtac	900
aaccttgacc	taaccaatct	caaccagcca	ctgctggatg	tggaccacac	atcttcaaga	960
cttaatctt	tgacacctcg	acatttgaat	cagaagggga	aagcgcttcc	tttaagcagt	1020
gctgagaaga	ggaaagccaa	atggaaagt	ctgcagaata	aacagatact	ggttccagaa	1080
ctctgtgcta	tacatccaat	tccagcatca	ctgtggagaa	aagctgttg	tctccccagc	1140
atactttatc	gccttcactg	cctttgact	gcagaggagc	taagagccca	gactgccagc	1200
gatgctggcg	tgggagtcag	atcacttcct	gcggatttt	gataccctaa	cttagacttc	1260
gggtggaaaa	aatctattga	cagcaaatct	ttcatctcaa	tttctaactc	ctttcagct	1320
gaaaatgata	attactgtaa	gcacagcaca	attgtccctg	aaaatgctgc	acatcaaggt	1380
gctaataaaaa	cctcctctct	agaaaatcat	gaccaaattgt	ctgtgaactg	cagaacgttg	1440
ctcagcgagt	cccctggtaa	gctccacgtt	gaagtttcag	cagatctac	agcaattaat	1500
ggtctttctt	acaatcaaaa	tctcgccaat	ggcagttatg	attagctaa	cagagacttt	1560
tgccaaggaa	atcagctaaa	ttactacaag	cagggaaatac	ccgtgcaacc	aactacctca	1620
tattccattc	agaatttata	cagttacgag	aaccagcccc	agcccagcga	tgaatgtact	1680
ctcctgagta	ataaataacct	tgtggaaat	gctaacaaat	ctacctcaga	tggaagtccct	1740
gtgatggccg	taatgcctgg	tacgacagac	actattcaag	tgctcaaggg	caggatggat	1800

tctgagcaga gcccttctat tgggtactcc tcaaggactc ttggccccaa tcctggactt 1860
 attcttcagg ctttgactct gtcaaacgct agtgatggat ttaacctgga gcggcttgaa 1920
 atgcttggcg actcctttt aaagcatgcc atcaccacat atctatttg cacttaccct 1980
 gatgcgcattg agggccgcct ttcataatatg agaagaaaaa aggtcagcaa ctgtaatctg 2040
 tatcgccttg gaaaaaaagaa gggactaccc agccgcattgg tggtgtcaat atttgatccc 2100
 cctgtgaatt ggcttcctcc tggttatgta gtaaatcaag acaaaagcaa cacagataaa 2160
 tggaaaaaaag atgaaaatgac aaaagactgc atgctggcga atggcaaact ggatgaggat 2220
 tacgaggagg aggatgagga ggaggagagc ctgatgtgga gggctccgaa ggaagaggct 2280
 gactatgaag atgatttcct ggagtatgat caggaacata tcagattat agataatatg 2340
 ttaatggggt caggagctt tgtaaagaaa atctctctt ctccttttc aaccactgat 2400
 tctgcataatg aatggaaaaat gccaaaaaaa tcctccttag gtagtatgcc atttcatca 2460
 gatttgagg atttgacta cagctttgg gatgcaatgt gctatctgga tcctagcaaa 2520
 gctgtgaag aagatgactt tgtggggggg ttctggaatc catcagaaga aaactgtggt 2580
 gttgacacgg gaaagcagtc catttcttac gacttgcaca ctgagcagtg tattgctgac 2640
 aaaagcatag cggaactgtgt ggaagccctg ctgggctgct attaaccag ctgtggggag 2700
 agggctgctc agctttcct ctgttcaactg gggctgaagg tgctcccggt aattaaaagg 2760
 actgatcggg aaaaggccct gtgccctact cgggagaatt tcaacagcca acaaaagaac 2820
 ctttcagtga gctgtgctgc tgcttctgtg gccagttcac gctttctgt attgaaagac 2880
 tcgaaatatg gttgttgaa gattccacca agatgtatgt ttgatcatcc agatgcagat 2940
 aaaacactga atcacctt atcggggttt gaaaattttg aaaagaaaaat caactacaga 3000
 ttcaagaata aggcttacct tctccaggct tttacacatg cctcctacca ctacaatact 3060
 atcaactgatt gttaccagcg cttagaattc ctgggagatg cgatttggatcata 3120
 accaaggcacc tttatgaaga cccgcggcag cactcccggt gggcctgac agacctgcgg 3180
 tctgcccctgg tcaacaacac catcttgcata tcgctggctg taaagtacga ctaccacaag 3240
 tacttcaaag ctgtctctcc tgagctcttc catgtcattt atgacttgcgttgcag 3300

cttgagaaga atgaaatgca aggaatggat tctgagctta ggagatctga ggaggatgaa 3360
 gagaaaagaag aggatattga agttccaaag gccatggggg atattttga gtcgcggc 3420
 ggtgccattt acatggatag tggatgtca ctggagacag tctggcagggt gtactatccc 3480
 atgatgcggc cactaataga aaagtttct gcaaatgtac cccgttcccc tgtgcgagaa 3540
 ttgcttgaaa tggaaccaga aactgccaaa tttagcccg ctgagagaac ttacgacggg 3600
 aaggtcagag tcactgtgga agtagtagga aagggaaat taaagggtgt tggtcgaagt 3660
 tacaggattt ccaaattcgc agcagcaaga agagccctcc gaagcctcaa agctaataa 3720
 cctcagggttc ccaatagcta a 3741

<210> 17

<211> 1246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 17

Ala	Ser	Ile	Val	Gly	Pro	Pro	Met	Ser	Cys	Val	Arg	Leu	Ala	Glu	Arg
1															

Val	Val	Ala	Leu	Ile	Cys	Cys	Glu	Lys	Leu	His	Lys	Ile	Gly	Glu	Leu
20															

Asp	Asp	His	Leu	Met	Pro	Val	Gly	Lys	Glu	Thr	Val	Lys	Tyr	Glu	Glu
35															

Glu	Leu	Asp	Leu	His	Asp	Glu	Glu	Glu	Thr	Ser	Val	Pro	Gly	Arg	Pro
50															

Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Arg	Gln	Cys	Tyr	Pro	Lys	Ala	Ile	Pro	Glu	Cys
65															

Leu	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Arg	Pro	Asp	Gln	Pro	Cys	Tyr	Leu	Tyr	Val
85															

Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp Glu Leu Asn Phe Arg
100 105 110

Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr Arg Cys Phe Gly Ile
115 120 125

Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His Phe Pro Val Tyr Thr
130 135 140

Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu Lys Lys Ser Gly Phe
145 150 155 160

Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr Arg Leu His Gln Tyr
165 170 175

Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro Ala Leu Glu Phe Lys
180 185 190

Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu Pro Leu Asn Val Val
195 200 205

Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys Phe Met Glu Asp Ile
210 215 220

Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser Thr Lys Tyr Thr Lys
225 230 235 240

Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr Gln Asp Ala Val Ile
245 250 255

Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His Arg Phe Tyr Val Ala
260 265 270

Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys Phe Pro Ser Pro Glu
275 280 285

Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys Tyr Asn Leu Asp Leu
 290 295 300

Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp His Thr Ser Ser Arg
 305 310 315 320

Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln Lys Gly Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln
 340 345 350

Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro
 355 360 365

Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg
 370 375 380

Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser
 385 390 395 400

Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro
 405 410 415

Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile
 420 425 430

Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His
 435 440 445

Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr
 450 455 460

Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu
 465 470 475 480

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp Leu
 485 490 495

Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn Gly Ser
500 505 510

Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln Leu Asn Tyr
515 520 525

Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser Tyr Ser Ile Gln
530 535 540

Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro Ser Asp Glu Cys Thr
545 550 555 560

Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala Asn Lys Ser Thr Ser
565 570 575

Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile
580 585 590

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly
595 600 605

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala
610 615 620

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu
625 630 635 640

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe
645 650 655

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser
660 665 670

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly
675 680 685

Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp
 690 695 700

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys
 705 710 715 720

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys
 725 730 735

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Asp Glu Glu Glu Ser Leu Met
 740 745 750

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu
 755 760 765

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser
 770 775 780

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp
 785 790 795 800

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met
 805 810 815

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala
 820 825 830

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Asp Asp Phe Val
 835 840 845

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly
 850 855 860

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp
 865 870 875 880

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr
 885 890 895

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu
 900 905 910

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys
 915 920 925

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser
 930 935 940

Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp
 945 950 955 960

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His
 965 970 975

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn
 980 985 990

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu
 995 1000 1005

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp
 1010 1015 1020

Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr
 1025 1030 1035

Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro
 1040 1045 1050

Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile
 1055 1060 1065

Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys
 1070 1075 1080

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln
1085 1090 1095

Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu
1100 1105 1110

Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val
1115 1120 1125

Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile
1130 1135 1140

Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr
1145 1150 1155

Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val
1160 1165 1170

Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr
1175 1180 1185

Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg
1190 1195 1200

Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly
1205 1210 1215

Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala Leu
1220 1225 1230

Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser
1235 1240 1245

<210> 18

<211> 1267

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 18

Met Asn His Lys Val His His His His Ile Glu Gly Arg Asn
1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys Val
20 25 30

Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu His
35 40 45

Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu Thr
50 55 60

Val Lys Tyr Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr Ser
65 70 75 80

Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro Lys
85 90 95

Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln Pro
100 105 110

Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp
115 120 125

Glu Leu Asn Phe Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr
130 135 140

Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His
145 150 155 160

Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu
165 170 175

Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr
180 185 190

Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro
195 200 205

Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu
210 215 220

Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys
225 230 235 240

Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser
245 250 255

Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr
260 265 270

Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His
275 280 285

Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys
290 295 300

Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys
305 310 315 320

Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp
325 330 335

His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln
340 345 350

Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys
355 360 365

Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala
370 375 380

Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro
 385 390 395 400

Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg
 405 410 415

Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala
 420 425 430

Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp
 435 440 445

Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ala Glu Asn Asp
 450 455 460

Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln
 465 470 475 480

Gly Ala Asn Arg Thr Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val
 485 490 495

Asn Cys Arg Thr Leu Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu
 500 505 510

Val Ser Ala Asp Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn
 515 520 525

Leu Ala Asn Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly
 530 535 540

Asn Gln Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr
 545 550 555 560

Ser Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro
 565 570 575

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala
 580 585 590

Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly
595 600 605

Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln
610 615 620

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly
625 630 635 640

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn
645 650 655

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile
660 665 670

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu
675 680 685

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu
690 695 700

Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp
705 710 715 720

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys
725 730 735

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met
740 745 750

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Asp Glu Glu
755 760 765

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu
770 775 780

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn
 785 790 795 800

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro
 805 810 815

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser
 820 825 830

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr
 835 840 845

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu
 850 855 860

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys
 865 870 875 880

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu
 885 890 895

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu
 900 905 910

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu
 915 920 925

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg
 930 935 940

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys
 945 950 955 960

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser
 965 970 975

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg
 980 985 990

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile
995 1000 1005

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys
1010 1015 1020

Asn Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His
1025 1030 1035

Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly
1040 1045 1050

Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp
1055 1060 1065

Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala
1070 1075 1080

Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp
1085 1090 1095

Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val
1100 1105 1110

Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln
1115 1120 1125

Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys
1130 1135 1140

Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu
1145 1150 1155

Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu
1160 1165 1170

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu
 1175 1180 1185

Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu
 1190 1195 1200

Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr
 1205 1210 1215

Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly
 1220 1225 1230

Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala
 1235 1240 1245

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln
 1250 1255 1260

Val Pro Asn Ser
 1265

<210> 19
 <211> 3804
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 19	
atgaatcaca aagtgcata tcatacatcat catatcgaaat gtaggaattt gagctcggtt	60
ccgcctcca ttgttggtcc accaatgagc tgtgtacgtat tggctgaaat agttgtcgct	120
ctcatttgct gtgagaaaact gcacaaaatt ggcgaactgg atgaccattt gatgccagtt	180
gggaaagaga ctgttaaata tgaagaggag cttgatttgc atgatgaaga agagaccagt	240
gttccaggaa gaccagggttc cacgaaacga aggcagtgtt acccaaaaagc aattccagag	300
tgtttgaggg atagtttatcc cagacactgtat cagccctgtt acctgtatgt gataggaatg	360
gtttaacta caccttacc tcatgaaactc aacttttagaa ggcggaaatctatcctcct	420

gaagatacca caagatgctt tggaataactg acggccaaac ccataacctca gattccacac 480
 tttcctgtgt acacacgctc tggagagggtt accatatcca tttagttgaa gaagtctgg 540
 ttcatgttgt ctctacaat gcttgagttt attacaagac ttcaccagta tatattctca 600
 catattcttc ggcttgaaaa acctgcacta gaatttaaac ctacagacgc tgattcagca 660
 tactgtgttc tacctcttaa tggatgtttaat gactccagca ctttggatat tgactttaaa 720
 ttcatggaag atattgagaa gtctgaagct cgcataggca ttcccagtac aaagtataaca 780
 aaagaaacac cctttgttt taaattagaa gattaccaag atgccgttat cattccaaga 840
 tatcgcaatt ttgatcagcc tcacgcattt tatgttagctg atgtgtacac tgatcttacc 900
 ccactcgat aatttccttc ccctgagttt gaaactttt cagaatatta taaaacaaag 960
 tacaacctt acctaaccaa tctcaaccag ccactgctgg atgtggacca cacatctca 1020
 agacttaatc ttttgacacc tcgacattt aatcagaagg ggaaagcgc tccttaagc 1080
 agtgcgtgaga agaggaaagc caaatggaa agtctgcaga ataaacagat actggttcca 1140
 gaactctgtg ctatacatcc aattccagca tcactgtgga gaaaagctgt ttgtctcccc 1200
 agcatactt atgccttca ctgcctttt actgcagagg agctaagagc ccagactgcc 1260
 agcgatgctg gcgtggagt cagatcactt cctgcggatt tttagataccc taacttagac 1320
 ttccgggtgga aaaaatctat tgacagcaaa tcttcatct caatttctaa ctcccttca 1380
 gctgaaaatg ataattactg taagcacagc acaattgtcc ctgaaaatgc tgcacatcaa 1440
 ggtgctaata gaaccccttc tctagaaaaat catgaccaaa tgtctgtgaa ctgcagaacg 1500
 ttgctcagcg agtccctgg taagctccac gttgaagttt cagcagatct tacagcaatt 1560
 aatggtcttt cttacaatca aatctcgcc aatggcagtt atgatttgc taacagagac 1620
 ttttgcctt gaaatcagct aaattactac aagcaggaaa taccctgtca accaactacc 1680
 tcatattcca ttcagaattt atacagttac gagaaccagc cccagccag cgatgaatgt 1740
 actctcctga gtaataaata ctttgatgga aatgctaaca aatctaccc agatggaaatgt 1800
 cctgtgtgg ccgtaatgcc tggtagac gacactattc aagtgcctaa gggcaggatg 1860
 gattctgagc agagcccttc tattgggtac tcctcaagga ctcttggccc caatcctgga 1920

cttattcttc aggcttgac tctgtcaaac gctagtgatg gatttaacct ggagcggctt 1980
 gaaatgcttg gcgactcctt tttaagcat gccatcacca catatctatt ttgcacttac 2040
 cctgatgcgc atgagggccg ccttcataat atgagaagca aaaaggtcag caactgtaat 2100
 ctgtatcgcc ttggaaaaaa gaagggacta cccagccgca tggtggtgtc aatatttgc 2160
 ccccctgtga attggcttcc tcctggttat gtagtaaatc aagacaaaag caacacagat 2220
 aaatggaaa aagatgaaat gacaaaagac tgcatgctgg cgaatggcaa actggatgag 2280
 gattacgagg aggaggatga ggaggaggag agcctgatgt ggagggctcc gaaggaagag 2340
 gctgactatg aagatgattt cctggagtat gatcaggaac atatcagatt tatagataat 2400
 atgttaatgg ggtcaggagc tttgtaaag aaaatctctc tttctcctt ttcaaccact 2460
 gattctgcat atgaatggaa aatgcccaa aaatcctcct taggttagtat gccatttca 2520
 tcagatttg aggatttga ctacagctct tggatgcaa tgtgctatct ggatcctagc 2580
 aaagctgttg aagaagatga ctttgtggtg gggttctgga atccatcaga agaaaactgt 2640
 ggtgttgaca cggaaagca gtccatttct tacgacttgc acactgagca gtgtattgct 2700
 gacaaaagca tagcggactg tgtggaagcc ctgctggct gctatttaac cagctgtggg 2760
 gagagggctg ctcagcttt cctctgttca ctgggctga aggtgctccc ggttaattaaa 2820
 aggactgatc gggaaaaggc cctgtgccct actcgggaga atttcaacag ccaacaaaag 2880
 aactttcag tgagctgtgc tgctgcttct gtggccagtt cacgcttttc tgtattgaaa 2940
 gactcgaat atggttgttt gaagattcca ccaagatgta tggatgtca tccagatgca 3000
 gataaaacac tgaatcacct tatatcgggg tttgaaaatt ttgaaaagaa aatcaactac 3060
 agattcaaga ataaggctta ccttctccag gctttacac atgcctccta ccactacaat 3120
 actatcactg attgttacca gcgcttagaa ttcctggag atgcgatttt ggactacctc 3180
 ataaccaagc acctttatga agaccccgccg cagcactccc cgggggtcct gacagacctg 3240
 cggtctgccc tggtcaacaa caccatctt gcatcgctgg ctgtaaagta cgactaccac 3300
 aagtacttca aagctgtctc tcctgagctc ttccatgtca ttgatgactt tgtgcagtt 3360
 cagcttgaga agaatgaaat gcaaggaatg gattctgagc ttaggagatc tgaggaggat 3420

gaagagaaaag aagaggatat tgaagttcca aaggccatgg gggatatttt tgagtgcctt 3480
gctggtgcca ttacatgga tagtggatg tcactggaga cagtctggca ggtgtactat 3540
cccatgatgc ggccactaat agaaaagttt tctgcaaatg taccccggttc ccctgtgcga 3600
gaattgcttg aaatggaacc agaaactgcc aaatttagcc cggctgagag aacttacgac 3660
ggaaaggta gagtcactgt ggaagtagta ggaaaggggaa aatttaaagg tgggtcgaa 3720
agttacagga ttgccaaatc tgcagcagca agaagagccc tccgaagcct caaagctaataat 3780
caacctcagg ttcccaatag cttaaa 3804

【書類名】要約書

【要約】

【課題】

特定の長さの d s RNA を生成させる活性を有する、 d s RNA 分解活性を有するタンパク質の提供、 RNA 干渉等に利用可能な特定の長さの d s RNA を効率よく生成させる方法並びに RNA 合成の促進方法を提供すること。

【解決手段】

長鎖の d s RNA に作用して特定の長さの d s RNA を生成させる活性を有する、 d s RNA 分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質、例えば RNA 結合活性を有するタンパク質の共存下で d s RNA に d s RNA 分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さの d s RNA を効率よく調製できる方法及び当該核酸結合活性を有するタンパク質が d s RNA 合成に代表される RNA 合成反応においてもその効率を向上させる方法。

【選択図】

なし

特願 2003-342126

出願人履歴情報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日

2002年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

氏 名

タカラバイオ株式会社